

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 35 168.6

**Anmeldetag:** 01. August 2002

**Anmelder/Inhaber:** Aventis Pharma Deutschland GmbH,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Reinigung von Preproinsulin

**IPC:** C 07 K 14/62

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Februar 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, likely belonging to the President of the German Patent and Trademark Office.

02.02.2003

## Beschreibung

### Verfahren zur Reinigung von Preproinsulin

- 5 Weltweit leiden etwa 12 Mio. Menschen an dem Typ 1 des Diabetes mellitus, der durch eine unzureichende körpereigene Produktion des Hormons Insulin gekennzeichnet ist. Für diesen Typus des Diabetes mellitus stellt die Substitution der fehlenden endokrinen Insulinsekretion durch Applikation von Insulinpräparaten die einzig mögliche Therapieform dar.

10

Insulinpräparate sind pharmazeutische Zubereitungen, die als Wirkstoff das Hormon Insulin enthalten. Dabei werden nicht nur natürlich vorkommende Insuline verwendet, sondern auch Insulinanaloga und Insulinderivate.

- 15 Das in der menschlichen Bauchspeicheldrüse produzierte Humaninsulin ist ein Polypeptid bestehend aus 51 Aminosäureresten, die sich auf 2 Peptidketten verteilen: die A-Kette mit 21 Aminosäureresten und die B-Kette mit 30 Aminosäureresten. In beiden Peptidketten ist die Sequenz der Aminosäurereste genetisch determiniert und bekannt. Beide Ketten sind durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Daneben befindet sich in der A-Kette noch eine intrachainare Disulfidbrücke.

- Insulinanaloga unterscheiden sich vom Humaninsulin durch Substitution wenigstens eines Aminosäurerestes und/oder Addition oder Entfernen wenigstens eines
- 25 Aminosäurerestes. Insulinanaloga können entweder in anderen Spezies als dem Menschen natürlich vorkommen oder sie können künstlich hergestellt worden sein. Insulinderivate enthalten chemisch modifizierte Aminosäurereste, die z.B. zusätzliche Ester- oder Amidogruppen enthalten, ansonsten aber die humane oder eine analoge Aminosäuresequenz zeigen.

In der Regel zeigen Insulinanaloga bzw. Insulinderivate gegenüber dem unmodifizierten Humaninsulin eine veränderte Wirkungskinetik.

Seit einigen Jahren werden das Humaninsulin und die Insulinanaloga bzw.

- 5 Insulinderivate durch die rekombinante DNA Technologie hergestellt. In industriellen Verfahren wird zum Beispiel zuerst ein entsprechender precursor der Formel 1, das Preproinsulin (PPI) hergestellt, aus dem durch enzymatische Spaltung das Humaninsulin oder die Insulinanaloga hergestellt werden. Zum Beispiel besteht ein gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von Humaninsulin aus folgenden
- 10 Verfahrensschritten:

- a) Fermentation der gentechnisch veränderten Mikroorganismen
- b) Ernten der Mikroorganismen und Zellaufschluß
- c) Isolierung der Einschußkörper mit dem ungelösten Fusionsprotein
- 15 d) Auflösen des Fusionproteins mit korrekter Faltung der Peptidkette und mit gleichzeitiger Schließung der Disulfidbrücken zum Preproinsulin
- e) Enzymatische Spaltung des Preproinsulins zum Humaninsulin
- f) Reinigung des Humaninsulins
- g) Kristallisation des Humaninsulins und Trocknung des Abgabeprodukts

20

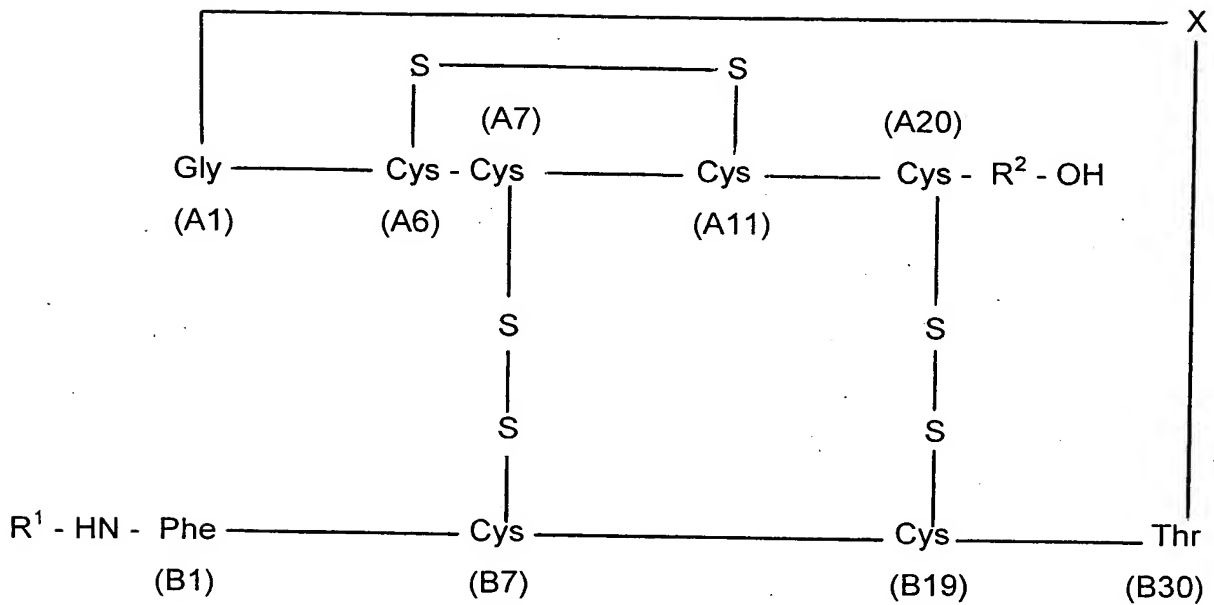
Bei der Herstellung eines Insulinanalogons ist die Aminosäuresequenz (der A- und B-Kette) in den entsprechenden Bereichen des Preproinsulins bereits vorgegeben.

Für die enzymatische Spaltung der verschiedenen Preproinsuline werden Proteasen, wie zum Beispiel das Enzym Trypsin und falls notwendig zusätzlich das Enzym

25 Carboxypeptidase B verwendet.

Das Preproinsulin ist ein Protein der Formel 1,

30



R<sup>1</sup>-B1-B30-X-A1-A20-R<sup>2</sup>

(1)

in der

X

- a) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder  
 b) ein Peptid mit 2 bis 35 Aminosäureresten, wobei am Anfang und am Ende des Peptids jeweils ein basischer Aminosäurerest, insbesondere Arg steht, und für den Fall, dass das Peptid aus mehr als 3 Aminosäureresten besteht, am Anfang und Ende des Peptids jeweils zwei basische Aminosäurereste, insbesondere Arg und/oder Lys stehen,

R<sup>1</sup>

- a) ein Wasserstoffatom,  
 b) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder  
 c) ein Peptid mit 2 bis 15 Aminosäureresten,

R<sup>2</sup>

ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest ist und

und die Reste A1 – A20 der Aminosäuresequenz der A-Kette von Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen und die Reste B1 – B30 der

Aminosäuresequenz der B-Kette von Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen.

Das Preproinsulin ist bevorzugt ein Protein der Formel 1, in der

X ein Peptid mit 35 Aminosäureresten mit der Sequenz der C-Kette von Humaninsulin oder Affeninsulin, oder ein Peptid mit 29 Aminosäuren mit der Sequenz:

Arg-Asp-Val-Pro-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg (SEQ ID NO: 1)

R<sup>1</sup> ein Peptid mit 2 bis 15 Aminosäureresten, an dessen Carboxylende der Aminosäurerest Arg steht,

R<sup>2</sup> der Aminosäurerest Asn oder Gly steht,

und die Reste A1 – A20 der Aminosäuresequenz der A-Kette von Humaninsulin entsprechen und die Reste B1 – B30 der Aminosäuresequenz der B-Kette von Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen, bei dem in der B3-Position Lys anstatt Asn und in der B29-Position Glu anstatt Lys stehen.

In der Prozessstufe – Auflösen des Fusionsproteins mit korrekter Faltung der Peptidkette und mit gleichzeitiger Schließung der Disulfidbrücken zum Preproinsulin – entstehen neben dem erwünschten monomeren Preproinsulin in einer Konkurrenzreaktion auch polymere Formen des Preproinsulins. Diese polymeren Preproinsuline lassen sich aufgrund ihres höheren Molekulargewichtes durch die HPLC-GPC-Analyse oder durch die Methode der dynamischen Lichtstreuung nachweisen. Um diese unerwünschte Konkurrenzreaktion zurückzudrängen muss die Anfangskonzentration des Fusionsproteins möglichst gering sein (De Bernadez et al., Meth. Enzym. 309:217, 1999). In der Praxis entsteht in dieser Prozessstufe das Preproinsulin in einer Konzentration von ca. 0,5 bis 1 g/L und zusätzlich findet man ca. 40 % höhermolekulare Anteile. Unter den höhermolekularen Anteilen befinden sich die polymeren Preproinsuline.

Es wurde im Rahmen dieser Erfindung überraschenderweise gefunden, dass die polymeren Formen der Preproinsuline die Stabilität der Insuline auf den nachfolgenden Prozessstufen negativ beeinflussen, indem sie die Denaturierung der nativen Insuline induzieren. Es ist bekannt, dass während der Reaktionskette der Denaturierung in einem ersten reversiblen Schritt aus den gelösten monomeren Insulinmolekülen lineare Aggregate entstehen, in denen die Wiederholungseinheiten durch physikalische Adhäsionskräfte zusammengehalten werden. In einer irreversiblen Folgereaktion entstehen aus den gelösten Aggregaten stabile unlösliche Aggregatbündel (Fibrillen), die ihrerseits in einem autokatalytischen Prozess die Denaturierung nativer Insuline induzieren. Diese unlöslichen Insulinfibrillen sind nicht nur biologisch inaktiv, sondern sie können auch zum Verstopfen von Injektionskanülen bei der Applikation der pharmazeutischen Insulinpräparate führen. Daneben werden sie auch für immunologische Unverträglichkeitsreaktionen verantwortlich gemacht, die gelegentlich während der Therapie mit Insulinpräparaten auftreten können (J.Bränge et al, J. Pharm. Sc. 1997, 86, 517-525; R.E. Ratner et al., Diabetes, 39, 728-733, 1990).

In der weiteren Folge des Insulin-Herstellungsprozesses wird das Preproinsulin mit Hilfe der Enzyme Trypsin und Carboxypeptidase B in Humaninsulin umgewandelt (siehe Kemmler, W., Peterson, J.D., and Steiner, D.F., J. Biol. Chem., 246 (1971) 6786-6791). Dabei werden das Verbindungspeptid zwischen der A- und B-Kette (X in der Formel 1) und der Preteil am Aminoende der B-Kette ( $R^1$  in der Formel 1) abgespalten. Bei der enzymatischen Reaktion mit Trypsin werden nicht nur diejenigen Peptidbindungen gespalten, deren Spaltung zum Humaninsulin führt, sondern in einer konkurrierenden Reaktion auch andere Peptidbindungen, deren Spaltung zu mehreren unerwünschten Nebenprodukten führt. Besonders unerwünscht ist die Bildung von des-Thr-Insulin durch zusätzliche Spaltung zwischen den Aminosäureresten B29 und B30 in Formel 1 (siehe EP 0 264 250 B1). Die Abtrennung dieses Nebenproduktes in den nachfolgenden Reinigungsstufen führt zu großen Produktverlusten. Um diese unerwünschte Nebenreaktion zurückzudrängen, muss die Anfangskonzentration an Preproinsulin möglichst hoch sein, d.h. im Bereich von 8 – 25 g/L, entsprechend 1 – 3 mM (siehe EP 0 264 250 B1). Diese Forderung steht im Gegensatz zu der im vorvorgehenden Absatz erwähnten Forderung.

Aus dem oben gesagten geht hervor, daß es von Vorteil ist, zwischen der Herstellung des Preproinsulins und der Spaltung des Preproinsulins zum Insulin einen zusätzlichen Prozessschritt einzuführen, der die polymeren Preproinsuline möglichst vollständig entfernt und gleichzeitig die Konzentration des monomeren Preproinsulins möglichst stark erhöht. Dass bei diesem Prozessschritt eine möglichst hohe Stufenausbeute gewährleistet sein muss, ist eine zusätzliche Bedingung.

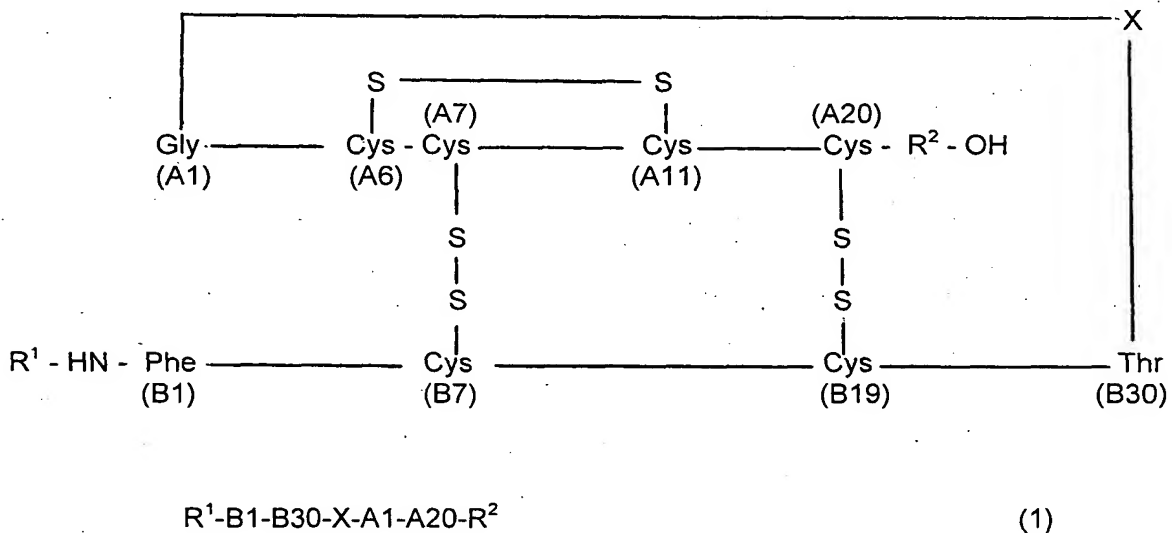
Es wurde deshalb vorgeschlagen (EP 0 600 372 B1), das Preproinsulin an ein hydrophobes Adsorberharz zu konzentrieren. Der Antragsteller konnte mit eigenen Versuchen zeigen, dass dabei zwar ein hoher Konzentrierungsfaktor von  $F = 10 - 15$  erreicht werden kann, aber praktisch keine Abtrennung der polymeren Preproinsuline erfolgt. Ein weiterer Vorschlag (D.F. Steiner et al., Diabetes, 17 (1968), 725-736) erwähnt die chromatographische Reinigung des Preproinsulins mit Hilfe eines Ionenaustauscherharzes. In eigenen Versuchen konnte mit einem Anionenaustauscherharz nur ein Konzentrierungsfaktor von  $F = 5$  und eine Abtrennung der höhermolekularen Anteile bis auf ca. 5 % erreicht werden. Mit einem Kationenaustauscherharz wurden zwar die höhermolekularen Anteile bis auf ca. 1 % abgetrennt, aber die Bindungskapazität des Harzes für das Preproinsulin erwies sich als unbefriedigend.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass die Kombination von einer Chromatographie an einem Anionenaustauscherharz im Durchflußmodus mit einer direkt anschließenden Chromatographie an einem Kationenaustauscherharz im Adsorptionsmodus deutlich bessere Resultate lieferte. Die vorliegende Erfindung bezieht sich deshalb auf ein Verfahren zur effektiven Abtrennung der höhermolekularen Substanzen aus einer wässrigen Lösung des Preproinsulins bei gleichzeitiger hoher Konzentrierung des monomeren Preproinsulins.

Erfindungsgemäß wird eine verdünnte wässrige Lösung eines Preproinsulins, wie sie während des Herstellungsprozesses von Insulin entsteht, bei pH 7,0 bis 9,0, vorzugsweise bei pH 7,5 bis 8,5 und einer Leitfähigkeit von 5 bis 7 mS/cm über eine Vorsäule gepumpt, die mit einem Anionenaustauscherharz, z.B. Source 30 Q, gefüllt ist. Dabei wird das monomere Preproinsulin nicht an das Harz gebunden, sondern läuft mit dem Permeat durch die Säule. Im Gegensatz dazu wird der größte Teil der

höhermolekularen Substanzen, inklusive der polymeren Preproinsuline, an das Harz adsorbiert und damit vom Preproinsulin abgetrennt. Das Wertstoff-haltige Permeat dieser Vorsäule wird in line mit Salzsäure auf pH 3,0 bis 5,5 , vorzugsweise auf pH 4,0 bis 5,0 eingestellt und anschließend direkt auf eine zweite Säule gepumpt, die mit einem Kationenaustauscherharz, z.B. Source 30 S, gefüllt ist. An dieses Harz wird das Preproinsulin adsorbiert und Verunreinigungen werden mit dem Permeat aus der Säule gespült. Mit Hilfe eines Elutionspuffers, der Natriumchlorid mit einer linear ansteigenden Konzentration von 1 bis 20 g/L, vorzugsweise 2,5 bis 15,0 g/L enthält, wird das Preproinsulin desorbiert. Das gereinigte Preproinsulin wird in einer Hauptfraktion aufgefangen, wogegen weitere Verunreinigungen in einer Vor- und Nachfraktion abgetrennt werden. In der Hauptfraktion, die > 90 % der Ausgangsmenge an Preproinsulin enthält, wurde eine Konzentration von 15 bis 20 g/L gemessen (Konzentrierungsfaktor F = 20 – 25). Die höhermolekularen Substanzen wurden bis auf einen Anteil von < 0,1 % abgetrennt. Das auf diese Weise gereinigte Preproinsulin kann durch Kristallisation aus der Lösung zwischenisoliert werden oder die Lösung kann direkt der Prozessstufe der enzymatischen Spaltung zugeführt werden.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur chromatographischen Reinigung von Preproinsulin der Formel 1,



in der



X a) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder  
 b) ein Peptid mit 2 bis 35 Aminosäureresten, wobei am Anfang und am Ende des Peptids jeweils ein basischer Aminosäurerest, insbesondere Arg steht, und für den Fall, dass das Peptid aus mehr als 3  
 5 Aminosäureresten besteht, am Anfang und Ende des Peptids jeweils zwei basische Aminosäurereste, insbesondere Arg und/oder Lys stehen,

R<sup>1</sup> a) ein Wasserstoffatom,  
 10 b) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder  
 c) ein Peptid mit 2 bis 15 Aminosäureresten,

R<sup>2</sup> ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest ist und

15 und die Reste A1 – A20 der Aminosäuresequenz der A-Kette von Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen und die Reste B1 – B30 der Aminosäuresequenz der B-Kette von Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen;

20 bei dem höhermolekulare Substanzen aus einer wäßrigen Lösung des Preproinsulins durch eine erste Chromatographie an einem Anionenaustauscher im Durchflussmodus und eine anschließende zweite Chromatographie an einem Kationenaustauscher im Adsorptionsmodus abgetrennt werden;

25 wobei das Preproinsulin folgende Aminosäuresequenz haben kann:

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-  
 Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-  
 Thr-Pro-Lys-Thr-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Pro-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-  
 30 Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-  
 Gln-Lys-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-  
 Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn; (SEQ ID NO: 2)

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-  
 Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-  
 Thr-Pro-Lys-Thr-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Pro-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-  
 Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-  
 5 Gln-Lys-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-  
 Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Gly; (SEQ ID NO: 3)

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Lys-Gln-His-Leu-Cys-Gly-  
 Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-  
 10 Thr-Pro-Glu-Thr-Arg- Asp-Val-Pro-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-  
 Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-Gly-Ile-Val-  
 Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn  
 (SEQ ID NO: 4).

- 15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren wie oben beschrieben zur  
 Abtrennung von Fremdsubstanzen aus den Lösungen von Preproinsulinen, welche  
 die Denaturierung von Insulin induzieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren wie oben beschrieben,  
 20 dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Chromatographie bei einem pH-Wert von  
 3,0 bis 5,5 durchgeführt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren wie oben beschrieben,  
 25 dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Chromatographie bei einem Druck von 1  
 bis 30 bar durchgeführt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Insulin  
 durch Expression ungefalteten Preproinsulins, umfassend die Schritte:

- a) Fermentation von gentechnisch veränderten Mikroorganismen, welche  
 30 ungefaltetes Preproinsulin exprimieren
- b) Ernten der Mikroorganismen und Zellaufschluß
- c) Isolierung der Einschußkörper mit ungelöstem, ungefalteten Preproinsulin
- d) Auflösen des Preproinsulins mit korrekter Faltung der Peptidkette und mit  
 gleichzeitiger Schließung der Disulfidbrücken zum Preproinsulin und

anschließendem Durchlaufen eines Verfahrens zur chromatographischen Reinigung von Preproinsulin der Formel 1 wie oben beschrieben

- e) Enzymatische Spaltung des Preproinsulins zum Humaninsulin
- f) Reinigung des Humaninsulins
- 5 g) Kristallisation des Humaninsulins und Trocknung

Im folgenden wird die Erfindung anhand der Beispiele näher erläutert, ohne sich darauf zu beschränken.

10

Beispiele:

Für die in den nachfolgenden Beispielen 1 bis 3 beschriebene Reinigung verschiedener Preproinsuline der Formel 1 wurde die Ausgangslösung in bekannter  
15 Weise (EP 0 489 780 und EP 0 600 372) entsprechend den oben erwähnten Prozessstufen a, b, c und d wie folgt hergestellt:

Während der Fermentation der Mikroorganismen (Prozessstufe a) wurden in den E.-Coli-Zellen Einschlußkörper gebildet, die das Fusionsprotein mit der  
20 Aminosäuresequenz des Preproinsulins enthielten. Nach Beendigung der Fermentation wurden die Zellen durch Zentrifugation isoliert und durch die übliche Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen (Prozessstufe b). Die dabei freigesetzten unlöslichen Einschlußkörper wurden durch Zentrifugation isoliert und auf der  
25 Zentrifuge mit Wasser gewaschen (Prozessstufe c). In der nachfolgenden Prozessstufe d wurden die Fusionsprotein-Einschlusskörper in einer 8 M Guanidinhydrochlorid-Lösung bei pH 10,8 gelöst. Nach Verdünnen mit Wasser und Zugabe von Cysteinhydrochlorid wurde das Fusionsprotein bei pH 10,8 und 4 °C unter Schließung der 3 Disulfidbrücken zu dem Preproinsulin der Formel 1 gefaltet. Anschließend wurde die Lösung mit 10 %iger Salzsäure auf pH 5 eingestellt und  
30 dabei Fremdproteine ausgefällt, die durch Zentrifugation abgetrennt wurden. Der Zentrifugenüberstand enthielt 0,6 bis 0,8 g/L monomeres Preproinsulin. Die Reinheit des Preproinsulins wurde mit der HPLC-RP-Analyse zu ca. 65 Flächen-% bestimmt. Mit der HPLC-GPC-Analyse wurde ein Anteil von ca. 45 Flächen-% höhermolekulare Verunreinigungen ermittelt.

## HPLC-RP-Analyse

Säule: LiChroCART 250-4 der Fa. Merck (Superspher 100-RP18e)  
 Instrument: Waters 2690  
 5 Software: Waters Millenium  
 Gradient: A: 25 Vol-% Acetonitril, 0,3 M NaCl in 0,05 M Phosphatpuffer  
 pH 2,5  
 B: 65 Vol-% Acetonitril, 0,05 M NaCl in 0,05 M Phosphatpuffer  
 pH 2,5

10 Der Gradient ist gekennzeichnet durch die folgenden Mengen  
 von

Puffer B nach den entsprechenden Laufzeiten:

0 Min. 4,0 % ; 20 Min. 17,0 % ; 30 Min. 37,0 % ; 40 Min. 4,0 %

Temperatur: 35 °C

15 Aufgabevolumen: 10 µl

Gesamtlaufzeit: 55 Min.

Flußrate: 1,0 ml/Min.

Detektion: 214 nm (Waters 2487)

20 Zur Ermittlung des Gehalts an Preproinsulin in der Aufgabelösung wurde der  
 Quotient aus der Peakfläche des Preproinsulins in der Analysenprobe und der  
 entsprechenden Peakfläche einer Standardsubstanz gebildet. Für die Ermittlung des  
 Reinheitsgrades wurde der Quotient aus der Peakfläche des Preproinsulins und der  
 25 Summe der Peakflächen von allen eluierbaren Substanzen in der Analysenprobe  
 gebildet.

## HPLC-GPC-Analyse

30 Säule: 2 Säulen in Serie, Edelstahl L = 300 mm; ID = 7,8 mm  
 Instrument: Pumpe: Waters 510 / Autosampler: Wisp 717  
 Software: Waters Millenium  
 Stationäre Phase: Shodex Protein KW 802.5 120-7-Diol

Trenngrenzen: 2 000 bis 80 000 Dalton  
 Mobile Phase: 30 Vol-% Acetonitril, 3,5 M Essigsäure, pH 3,0 eingestellt mit Ammoniakwasser  
 Gradient: isocratic  
 5 Temperatur: Raumtemperatur  
 Aufgabevolumen: 100 µl  
 Gesamtlaufzeit: 65 Min.  
 Flußrate: 0,5 ml/Min  
 Detektion: 276 nm (Waters 2487)

10

Zur Ermittlung des Anteils an höhermolekularen Substanzen wurde der Quotient aus den Peakflächen aller höhermolekularen Substanzen, die zeitlich vor dem monomeren Preproinsulin eluiert wurden, und der Summe der Peakflächen von allen eluierbaren Substanzen gebildet. Die Retentionszeit für das monomere Preproinsulin

15

### Beispiel 1

20

Aus dem entsprechend gentechnisch modifizierten E.-Coli-Zellen wurde nach Abschluß der oben erwähnten Prozessstufen a, b, c und d eine Lösung des Preproinsulins mit folgender Aminosäuresequenz erhalten:

25

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-  
 His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-  
 Lys-Thr-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Pro-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-  
 Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-Gly-Ile-Val-  
 Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ  
 ID NO: 2)

30

Dieses Preproinsulin entspricht der Formel 1, dabei ist

- X eine Peptidkette mit 35 Aminosäureresten mit der Sequenz des C-Peptids vom Affen
- R1 eine Peptidkette mit 10 Aminosäureresten mit der Sequenz: Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg (SEQ ID NO: 5)
- 5 R2 der Aminosäurerest Asn (identisch mit A21 der A-Kette vom Humaninsulin)
- A1-A20 Peptidkette mit der Sequenz (nur A1 bis A20) der A-Kette vom Humaninsulin
- B1-B30 Peptidkette mit der Sequenz der B-Kette vom Humaninsulin

10

Zur Reinigung der Preproinsulin-Lösung wurde eine Apparatur verwendet, die hauptsächlich aus zwei in Reihe angeordneten Chromatographie-Säulen und einem dazwischen angeordneten Rührgefäß bestand. In dem Rührgefäß wurde inline der pH-Wert der Lösung zwischen den beiden Säulen umgestellt.

15

In der ersten Chromatographie-Säule (Hersteller: Pharmacia, Durchmesser: 5 cm) wurde ein Gelbett (Betthöhe: 14 cm, Bettvolumen: 275 ml) mit dem Anionenaustauscherharz DEAE-Sephacel fast flow (Hersteller: Pharmacia Biotech; Prod.-Nr. 17-0709-05) hergestellt. Die Säule wurde von oben nach unten und bei

20 Normaldruck von 1 bar betrieben. Die Flussrate betrug 2000 ml/h. Vor der Säule waren ein Mehrwegeventil, eine Aufgabepumpe (Ismatec MV) und eine Blasenfalle installiert. Über das Mehrwegventil wurden nacheinander folgende Lösungen:

25

- 8,1 L Aufgabelösung
- 2,3 L Verdrängungspuffer
- 1,4 L Waschpuffer
- 1,4 L Regenerationslösung
- 2 L Equilibrierpuffer

30

auf die Säule gepumpt. Nach der Säule war eine UV-Sonde (275 nm mit Messwertregistrierung) und ein weiteres Mehrwegeventil installiert. Über das zweite Mehrwegventil wurden ca. 10,2 L Permeatfraktion in das oben erwähnte Rührgefäß und anschließend ca. 1 L Waschfraktion in ein Sammelgefäß geleitet. Die übrigen Permeate wurden über das Mehrwegeventil in den Biokanal entsorgt.

Die Chromatographie an dem Anionenaustauscher wurde im Durchflussmodus betrieben, d.h. die Bedingungen (pH 8,3 ; LF = 6,1 mS/cm) wurden so gewählt, dass der Wertstoff Preproinsulin nicht an das Gel gebunden, sondern während der Produktaufgabe mit dem Permeat durch die Säule gespült wurde. Dagegen wurden

5 Verunreinigungen an das Gel adsorbiert und mit dem Waschpuffer und der Regenerierlösung ausgeschleust.

Die verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Aufgabelösung für Säule 1:

Ausgangslösung (Zentrifugenüberstand)	8,0	L		
Natriumchlorid-Lösung 25 %ig (w/w)	100	ml	12,5	ml/L
Natronlauge 10 %ig (w/w)	ca. 4,5	ml	0,6	ml/L
Leitfähigkeit	pH 8,3			
Temperatur	LF 6,1	mS/cm		
	ca. 5	°C		

10

Gereinigtes Wasser	1	L		
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	4,0	g/L		
Natriumchlorid	2,5	g/L		
Salzsäure 25 %ig (w/w)	ca. 2,5	ml/L		
Leitfähigkeit	pH 8,0			
Temperatur	ca. 5,7	mS/cm		
		Raumtemperatur		

Gereinigtes Wasser	1	L		
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	5,0	g/L		
Natriumchlorid	15	g/L		
Salzsäure 25 %ig (w/w)	ca. 3	ml/L		
Leitfähigkeit	pH 8,0			
Temperatur	ca. 24	mS/cm		
		Raumtemperatur		

Regenerationslösung für Säule 1 und 2:

Gereinigtes Wasser	0,91	L		
Natriumchlorid	40	g	40	g/L
Natronlauge 33 %ig (w/w)	0,09	L	1	mol/L

15

Equilibrierpuffer für Säule 1:

Gereinigtes Wasser	1	L		
--------------------	---	---	--	--

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan		5,0	g/L
Natriumchlorid		2,0	g/L
Salzsäure 25 %ig (w/w)	ca.	3	ml/L
Leitfähigkeit	pH	8,0	
Temperatur	ca.	5,1	mS/cm

Raumtemperatur

Im Säulenauslauf wurde die Permeatfraktion, die den Wertstoff Preproinsulin enthielt, und die Waschfraktion, die den größten Teil der höhermolekularen Verunreinigungen enthielt, aufgefangen:

1. ca. 10,2 L Permeatfraktion  
(mit Beginn der Aufgabelösung, ab UV-Wert 20 % aufsteigend bis UV-Wert 35 % absteigend, während der Produkt-Verdrängung)
2. ca. 1 L Waschfraktion  
(während der Aufgabe des Waschpuffers, ab UV-Wert 30 % aufsteigend bis UV-Wert 40 % absteigend)

Alle übrigen Permeate wurden in den Biokanal entsorgt.

Das im Auslauf der Säule 1 gemessene UV-Diagramm ist in Figure 1 gezeigt.

Die Permeatfraktion der ersten Säule wurde in dem Zwischengefäß (Nennvolumen: 4 L, mit Rührer, pH-Sonde und Einleitungsrohr) inline mit 90 %iger Milchsäure auf pH 3,5 eingestellt und anschließend direkt auf die zweite Chromatographie-Säule gepumpt.

In der zweiten Chromatographie-Säule (Hersteller: Pharmacia, Durchmesser: 5 cm) wurde ein Gelbett (Betthöhe: 10,5 cm, Bettvolumen: 206 ml) mit dem Kationenaustauscher Source 30 S (Hersteller: Pharmacia Biotech; Prod.-Nr.: 17-1273-04) hergestellt. Die Säule wurde von oben nach unten und bei Normaldruck von 1 bar betrieben. Die Flussrate betrug ebenfalls 2000 ml/h. Vor der Säule war ein Mehrwegeventil, eine Aufgabepumpe und eine Blasenfalle installiert. Über das Mehrwegeventil wurden nacheinander folgende Lösungen:

10,2 L Aufgabelösung (= Permeatfraktion der Säule 1, auf pH 3,5 eingestellt)

0,5 L Verdrängungspuffer



- 3,0 L Elutionspuffer A/B (aus gleichen Teilen A und B)
- 2,3 L Regenerationslösung
- 2 L Equilibrierpuffer

5 auf die Säule gepumpt. Nach der Säule war eine UV-Sonde (275 nm mit Messwertregistrierung) und ein weiteres Mehrwegeventil installiert. Über das zweite Mehrwegeventil wurden ca. 1 L Hauptfraktion in ein Sammelgefäß geleitet. Die übrigen Permeate wurde über das Mehrwegventil in den Biokanal entsorgt.

10 Die Chromatographie an dem Kationenaustauscher wurde im Adsorptionsmodus betrieben, d.h. der Wertstoff Preproinsulin wurde während der Produktaufgabe an das Gel adsorbiert und (nach dem Verdrängen der Aufgabelösung) mit dem Elutionspuffer A/B wieder desorbiert. Um einen optimalen Reinigungseffekt zu erzielen, wurde ein linear ansteigender Natriumchlorid-Gradient im Elutionspuffer angewendet.

15

Die verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

#### Aufgabelösung für Säule 2:

Permeatfraktion der Säule 1	ca.	10,2	L	
Milchsäure 90 %ig		14,3	ml	1,4 ml/L
	pH	3,5		
Leitfähigkeit	ca.	6,3	mS/cm	
Temperatur	ca.	5	°C	

#### Verdrängungspuffer für Säule 2:

Gereinigtes Wasser		1	L	
Milchsäure 90 %ig		8,3	ml	0,1 mol/L
Natriumchlorid		2,5	g	2,5 g/L
Natronlauge 10 %ig (w/w)	ca.	8	ml	
	pH	3,5		
Leitfähigkeit	ca.	8	mS/cm	
Temperatur		Raumtemperatur		

20

#### Elutionspuffer A für Säule 2:

Der Elutionspuffer A ist mit dem Verdrängungspuffer für die Säule 2 identisch.

#### Elutionspuffer B für Säule 2:

Gereinigtes Wasser		1	L	
Milchsäure 90 %ig		8,3	ml	0,1 mol/L
Natriumchlorid		15,0	g	15,0 g/L

Natronlauge 10 %ig (w/w)	ca.	7	ml	
	pH	3,5		
Leitfähigkeit	ca.	25	mS/cm	
Temperatur		Raumtemperatur		

Regenerationslösung für Säule 1 und 2:

Gereinigtes Wasser	0,91	L		
Natriumchlorid	40	g	40	g/L
Natronlauge 33 %ig (w/w)	0,09	L	1	mol/L

5

Equilibrierpuffer für Säule 2:

Gereinigtes Wasser	1	L		
Milchsäure 90 %ig	8,3	g	0,1	mol/L
Natriumchlorid	2,9	g/L		
Natronlauge 10 %ig (w/w)	ca. 9	ml		
	pH	3,5		
Leitfähigkeit	ca. 8,5	mS/cm		
Temperatur		Raumtemperatur		

Im Säulenauslauf wurden die Hauptfraktion, die den Wertstoff Preproinsulin enthielt, aufgefangen:

10

ca. 1,0 L Hauptfraktion  
(während der Elution, ab UV-Wert 65 % aufsteigend bis UV-Wert 76 % absteigend)

15

Alle übrigen Permeate wurden in den Biokanal verworfen.

Das im Auslauf der Säule 2 gemessene UV-Diagramm ist in Figure 2 gezeigt.

In der gereinigten Lösung (Hauptfraktion der Säule 2) wurden 15 g/L Preproinsulin mit einem Reinheitsgrad von 89 Flächen-% gemessen (HPLC-RP-Analyse). Die Ausbeute betrug 91 % bezogen auf die Menge an Preproinsulin in der Ausgangslösung. Mit der HPLC-GPC-Analyse wurden 0,2 Flächen-% höhermolekulare Anteile bestimmt.

25

## Beispiel 2

Aus dem entsprechend gentechnisch modifizierten E.-Coli-Zellen wird nach Abschluß der oben erwähnten Prozessstufen a, b, c und d eine Lösung des

5 Preproinsulins mit folgender Aminosäuresequenz erhalten:

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-  
His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-  
Lys-Thr-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Pro-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-  
10 Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-Gly-Ile-Val-  
Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Gly (SEQ  
ID NO: 3)

Dieses Preproinsulin entspricht der Formel 1, dabei ist

15

X eine Peptidkette mit 35 Aminosäureresten mit der Sequenz des C-Peptids vom Affen

R1 eine Peptidkette mit 10 Aminosäureresten mit der Sequenz:  
Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg (SEQ ID NO: 5)

20 R2 der Aminosäurerest Gly

A1-A20 Peptidkette mit der Sequenz (nur A1 bis A20) der A-Kette vom Humaninsulin

B1-B30 Peptidkette mit der Sequenz der B-Kette vom Humaninsulin

25 Zur Reinigung der Preproinsulin-Lösung wurde wieder eine Apparatur verwendet, die hauptsächlich aus zwei in Reihe angeordneten Chromatographie-Säulen und einem dazwischen angeordneten Rührgefäß bestand. In dem Rührgefäß wurde inline der pH-Wert der Lösung zwischen den beiden Säulen umgestellt. Die Apparate für die zweite Chromatographie-Stufe waren druckstabil ausgelegt.

30

Die Chromatographie auf der Säule 1 und die Umstellung des pH-Wertes in dem Zwischengefäß wurde wie im Beispiel 1 beschrieben durchgeführt, so dass die Beschreibung und die Werte hier nicht noch einmal genannt werden.

In der zweiten Chromatographie-Säule (Hersteller: Prochrom, Durchmesser: 5 cm, Material: Edelstahl) wurde ein Gelbett (Betthöhe: 10 cm, Bettvolumen: 196 ml) mit dem Kationenaustauscher Source 30 S (Hersteller: Pharmacia Biotech; Prod.-Nr.: 17-1273-04) hergestellt. Die Säule wurde von oben nach unten und bei einem

5 Arbeitsdruck von 10 bar betrieben. Die Flussrate betrug 3500 ml/h. Vor der Säule war ein Mehrwegeventil, eine Aufgabepumpe (Hersteller: Besta; Typ: HD2-300) installiert. Über das Mehrwegeventil wurden nacheinander folgende Lösungen:

10,2 L Aufgabelösung (= Permeatfraktion der Säule 1, auf pH 4,6 eingestellt)

0,5 L Verdrängungspuffer

3,0 L Elutionspuffer A/B (aus gleichen Teilen A und B)

2,3 L Regenerationslösung

2 L Equilibrierpuffer

15 auf die Säule gepumpt. Nach der Säule war eine UV-Sonde (275 nm mit Messwertregistrierung) und ein weiteres Mehrwegeventil installiert. Über das zweite Mehrwegeventil wurde die Hauptfraktion, die das gereinigte Preproinsulin enthielt, in ein Sammelgefäß geleitet. Die übrigen Permeate wurden über das Mehrwegeventil in den Biokanal entsorgt.

20 Die Chromatographie an dem Kationenaustauscher wurde im Adsorptionsmodus betrieben, d.h. der Wertstoff Preproinsulin wurde während der Produktaufgabe an das Gel adsorbiert und (nach dem Verdrängen der Aufgabelösung) mit dem Elutionspuffer A/B wieder desorbiert. Um einen optimalen Reinigungseffekt zu

25 erzielen, wurde ein linearer Natriumchlorid-Gradient im Elutionspuffer angewendet.

Die verwendeten Lösungen hatten folgende Zusammensetzung:

Aufgabelösung für Säule 2:

Permeatfraktion der Säule 1	ca.	10,2	L	
Milchsäure 90 %ig		12,2	ml	1,2 ml/L
pH		4,6		
Leitfähigkeit	ca.	6,7	mS/cm	
Temperatur	ca.	5	°C	

## Verdrängungspuffer für Säule 2:

Gereinigtes Wasser		1	L	
Milchsäure 90 %ig		8,3	ml	0,1 mol/L
Natriumchlorid		2,5	g	2,5 g/L
Natronlauge 10 %ig (w/w)	ca.	27	ml	
	pH	4,6		
Leitfähigkeit	ca.	8	mS/cm	
Temperatur			Raumtemperatur	

## Elutionspuffer A für Säule 2:

Der Elutionspuffer A ist mit dem Verdrängungspuffer für die Säule 2 identisch.

## Elutionspuffer B für Säule 2:

Gereinigtes Wasser		1	L	
Milchsäure 90 %ig		8,3	ml	0,1 mol/L
Natriumchlorid		15,0	g	15,0 g/L
Natronlauge 10 %ig (w/w)	ca.	27	ml	
	pH	4,6		
Leitfähigkeit	ca.	25	mS/cm	
Temperatur			Raumtemperatur	

5

## Regenerationslösung für Säule 1 und 2:

Gereinigtes Wasser		0,91	L	
Natriumchlorid		40	g	40 g/L
Natronlauge 33 %ig (w/w)		0,09	L	1 mol/L

## Equilibrirpuffer für Säule 2:

Gereinigtes Wasser		1	L	
Milchsäure 90 %ig		8,3	g	0,1 mol/L
Natriumchlorid		2,9	g/L	
Natronlauge 10 %ig (w/w)	ca.	26	ml	
	pH	4,6		
Leitfähigkeit	ca.	8,7	mS/cm	
Temperatur			Raumtemperatur	

10

Im Säulenauslauf wurden die Hauptfraktion, die den Wertstoff Preproinsulin enthielt, aufgefangen:

ca. 0,9 L Hauptfraktion

15

(während der Elution, ab UV-Wert 65 % aufsteigend bis UV-Wert 76 % absteigend)

Alle übrigen Permeate wurden in den Biokanal verworfen.

In der gereinigten Lösung (Hauptfraktion der Säule 2) wurden 17 g/L Preproinsulin mit einem Reinheitsgrad von 93 Flächen-% gemessen (HPLC-RP-Analyse). Die Ausbeute betrug 92 % bezogen auf die Menge an Preproinsulin in der Ausgangslösung. Mit der HPLC-GPC-Analyse wurden <0,1 Flächen-% höhermolekulare Anteile bestimmt.

### Beispiel 3

Aus dem entsprechend gentechnisch modifizierten E.-Coli-Zellen wird nach Abschluß der oben erwähnten Prozessstufen a, b, c und d eine Lösung des Preproinsulins mit folgender Aminosäuresequenz erhalten:

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Lys-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Glu-Thr-Arg- Asp-Val-Pro-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO: 4)

Dieses Preproinsulin entspricht der Formel 1, dabei ist

X eine Peptidkette mit 29 Aminosäureresten mit der Sequenz:  
Arg- Asp-Val-Pro-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg (SEQ ID NO: 1)

R1 eine Peptidkette mit 10 Aminosäureresten mit der Sequenz:  
Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg (SEQ ID NO: 5)

R2 der Aminosäurerest Asn (A21 der A-Kette vom Humaninsulin)

A1-A20 Peptidkette mit der Sequenz (nur A1 bis A20) der A-Kette vom Humaninsulin B1-B30 Peptidkette mit einer analogen Sequenz zur B-Kette vom Humaninsulin, d.h. mit einem Austausch von Lys gegen Val in der Position B3 und einem Austausch von Glu gegen Lys in Position B29.

Zur Reinigung der Preproinsulin-Lösung wurde die gleiche Apparatur verwendet, die im Beispiel 1 verwendet wurde.

Für die Chromatographie auf der Säule 1 wurde diesmal das

- 5 Anionenaustauscherharz Source 30 Q (Hersteller: Pharmacia Biotech; Prod.-Nr.: 17-1275-04) verwendet. Zur Regeneration dieses Gels wurde die doppelte Menge an Regenerationslösung im Vergleich zu den Beispielen 1 und 2 gebraucht. Die übrigen Parameter der ersten Chromatographie, wie Zusammensetzung und Volumina der Lösungen, waren die gleichen wie in den Beispielen 1 und 2 beschrieben.

10

Ebenso wurde die Umstellung des pH-Wertes in dem Zwischengefäß wie im Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

15

Die zweite Chromatographie wurde diesmal bei einem Arbeitsdruck von 15 bar durchgeführt. Alle übrigen Parameter der zweiten Chromatographie waren die gleichen wie im Beispiele 2 beschrieben.

20

In der gereinigten Lösung (Hauptfraktion der Säule 2) wurden 17 g/L Preproinsulin mit einem Reinheitsgrad von 92,5 Flächen-% gemessen (HPLC-RP-Analyse). Die Ausbeute betrug 91 % bezogen auf die Menge an Preproinsulin in der Ausgangslösung. Mit der HPLC-GPC-Analyse wurden <0,1 Flächen-% höhermolekulare Anteile bestimmt.

25

### Denaturierungstest

Mit dem Denaturierungstest (Tabelle 1) wird gezeigt, dass die höhermolekularen polymeren Formen der Preproinsuline, wie sie während der Faltungsreaktion entstehen, die Denaturierung von nativem Insulin induzieren können.

30

In dem Denaturierungstest wurde natives Insulin glargin, ein Produkt der Firma Aventis Deutschland GmbH, das nach der enzymatischen Spaltung des im Beispiel 2 beschriebenen Preproinsulins erhalten wird, kristallisiert. Überraschenderweise konnten wir in eigenen Versuchen zeigen, dass unter den Bedingungen der Kristallisation des Insulin glargin (pH 6,1 und 26 °C), es zu einer Denaturierung des

nativen Insulins kommt, wenn dem Kristallisierungsansatz Substanzen zugesetzt werden, die die Denaturierung von Insulin induzieren können.

Für die Kristallisierungsansätze wurde eine Standard-Lösung folgender

5 Zusammensetzung hergestellt:

Insulin glargin	5	g/L
Zitronensäure	5,2	mmole/L
Zinkchlorid	3	mmole/L
10 Natriumchlorid	0,5	g/L
n-Propanol	7	%(v/v)
gereinigtes Wasser ad	500	ml
mit 1 N Salzsäure pH	3	

Die Lösung wurde durch ein Membranfilter mit 0,1 µm Porenweite filtriert.

15

In dem Denaturierungstest wurden zu dieser sauren Standardlösung Lösungen die verschiedenen Testsubstanzen zugesetzt: Die Waschfraktion der Säule 1, die die abgetrennten polymeren Formen der Preproinsuline in einer Konzentration von 5 g/L enthielt oder die Hauptfraktion der Säule 2, die das gereinigte Preproinsulin in einer

20 Konzentration von 15 bzw. 17 g/L enthielt. Als weiterer Beweis, dass die beobachteten Phänomene durch die Denaturierung von Insulin hervorgerufen wurden, diente der Zusatz von 10 ml einer 0,1 %igen wässrigen Stammlösung von Poloxamer 171. Es ist bekannt, dass Poloxamer 171 die Denaturierung von Insulin an hydrophoben Grenzflächen unterdrücken kann (H.Thurow and K.Geisen,

25 Diabetologia (1984) 27, 212-218 and EP 0 018 609).

Anschließend wurden die Lösungen auf 26 °C temperiert und unter Rühren mit 10 %iger Natronlauge auf pH 6,1 eingestellt, wobei das Insulin amorph ausfiel. Die amorphe Suspension wurde bei 26 °C über 50 Stunden gerührt. Nach dieser Zeit

30 waren in allen Ansätzen Insulinkristalle entstanden.

Zur Auswertung der Ansätze wurden Proben unter dem Mikroskop beurteilt, wobei auf das Auftreten von amorphen Partikeln (Schleier) im Hintergrund bzw. zwischen



den Insulinkristallen geachtet wurde. Zusätzlich wurde jeder Ansatz in 2 etwa gleichgroße Teile geteilt. Der 1. Teil wurde zur Untersuchung des Sedimentationsverhaltens in ein 250 ml - Messzylinder gegeben, wobei nach 60 Min. Stehen bei Raumtemperatur das Volumen des Sediments und die Klarheit des Überstandes bewertet wurden. Der zweite Teil wurde mit 1 N Salzsäure auf pH 3 eingestellt, wobei nach Auflösen der Insulinkristalle die Klarheit der entstandenen Lösung bewertet wurde.

Das Ergebnis des Denaturierungstests ist in Tabelle 1 gezeigt. In den Kontrollproben 174 A und 188 A ohne Zusatz der Polymerfraktion war keine Denaturierung beobachtet worden. Im Mikroskop waren Kristalle vor einem klaren Hintergrund zu erkennen. Nach 60 Minuten war die Kristalle sedimentiert, wobei eine kompakten Sediment und ein klarer Überstand entstanden waren. Nach Auflösen der Kristalle bei pH 3 war eine klare Lösung entstanden. Dagegen wurde in den Proben 174 B, 188 B bzw. 174 C, bei denen zum Kristallisieransatz 1 ml bzw. 5 ml Polymerfraktion zugesetzt worden waren, eine deutliche Denaturierung von Insulin glargin beobachtet. Im Mikroskop war zwischen den Kristallen ein amorpher Schleier zu erkennen. Im Sedimentationstest waren voluminöse Sedimente mit einem Sedimentvolumen von 50 bis 90 ml (aus 250 ml Kristallsuspension) entstanden. Nach Wiederauflösen der Kristalle bei pH 3 waren mehr oder weniger trübe amorphe Suspensionen entstanden. In Gegenwart von 20 ppm Poloxamer 171 war bei einem Zusatz von 1 ml Polymerlösung (188 C) keine Denaturierung beobachtet worden. In den Testansätzen 174 D, 174 E und 174 F, denen gereinigte Preproinsuline (Hauptfraktion der Säule 2 aus den Beispielen 1, 2 und 3) zugesetzt worden waren, konnte ebenfalls keine Denaturierung von Insulin glargin beobachtet werden.

Ähnliche, hier nicht gezeigte Ergebnisse wurden in einem analogen Denaturierungstest erhalten, bei dem Humaninsulin kristallisiert wurde.

Tabelle 1

Einfluß der höhermolekularen Verunreinigungen auf die Denaturierung von Insulin Glargin

Kristallisierungs- ansatz Nr.	Zusätze zum Kristallisationsansatz	Mikroskopisches Bild Aussehen des Hintergrundes (zwischen den Rhomboeder- Kristallen)	Aussehen nach Lösen der Kristalle bei pH 3	Sedimentations- verhalten der Kristallsuspension
174 A	Keine	klar	klar	+++
174 B	1 ml Waschrkt. Säule 1 *	Amorphe Partikel	schwach trüb	+ - -
174 C	5 ml Waschrkt. Säule 1 *	stärker amorphe Partikel	trüb	- - -
174 D	1 ml Hauptfrkt. Beispiel 1 **	klar	klar	+++
174 E	1 ml Hauptfrkt. Beispiel 2 ***	klar	klar	+++
174 F	1 ml Hauptfrkt. Beispiel 3 ****	klar	klar	+++
188 A	Keine	klar	klar	+++
188 B	1 ml Waschrkt. Säule 1 *	Amorphe Partikel	trüb	- - -
188 C	1 ml Waschrkt. Säule 1 * und 20 ppm Poloxamer 171	vereinzelt amorphe Partikel	klar	+++

Kristallisierungsansätze von jeweils 500 ml mit 2500 mg Insulin Glargin (= 5 g/L).  
 2 enthielt 5 g/L Protein.

+ + + = Nach ca. 60 Min. ein Sediment von 3 bis 5 ml aus 250 ml Suspension.

5 1 enthielt 15 g/L Preproinsulin

- - - = Nach ca. 60 Min. ein Sediment bis zu 90 ml aus 250 ml Suspension.

2 enthielt 17 g/L Preproinsulin

\* Die Waschrfraktion der Säule 1 aus Beispiel

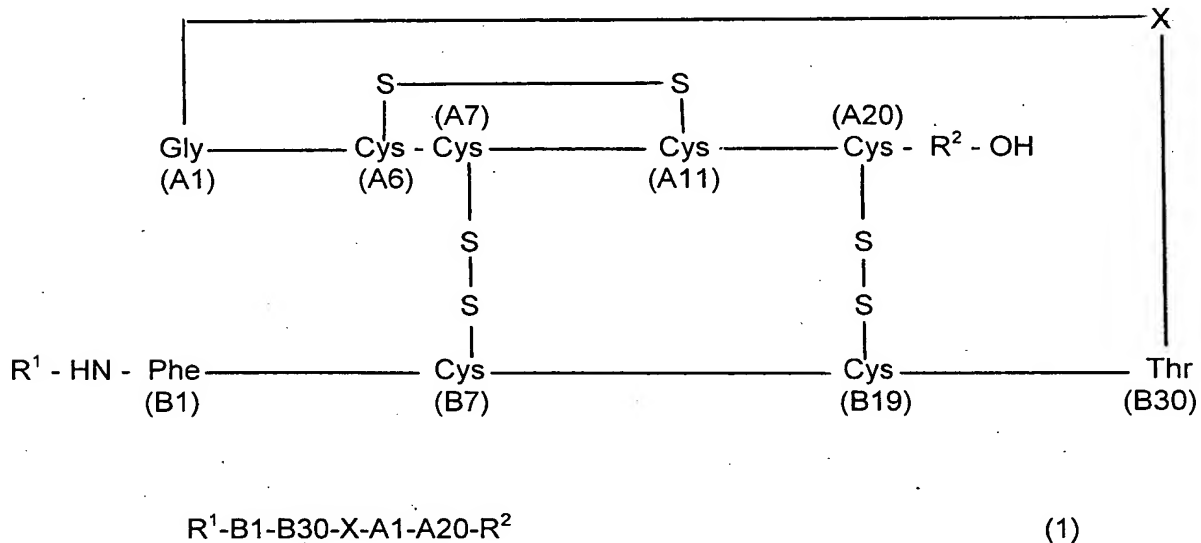
\*\* Die Hauptfraktion der Säule 2 aus Beispiel

\*\*\* Die Hauptfraktion der Säule 2 aus Beispiel

\*\*\*\* Die Hauptfraktion der Säule 2 aus Beispiel 3 enthielt 17 g/

Patentansprüche:

1. Verfahren zur chromatographischen Reinigung von Preproinsulin der Formel 1,



in der

X

- a) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder  
 b) ein Peptid mit 2 bis 35 Aminosäureresten, wobei am Anfang und am Ende des Peptids jeweils ein basischer Aminosäurerest, insbesondere Arg steht, und für den Fall, dass das Peptid aus mehr als 3 Aminosäureresten besteht, am Anfang und Ende des Peptids jeweils zwei basische Aminosäurereste, insbesondere Arg und/oder Lys stehen,

$R^1$

- a) ein Wasserstoffatom,  
 b) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder  
 c) ein Peptid mit 2 bis 15 Aminosäureresten,

$R^2$

ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest ist und

und die Reste A1 – A20 der Aminosäuresequenz der A-Kette von Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen und die Reste B1 –

B30 der Aminosäuresequenz der B-Kette von Humaninsulin oder einem Insulinanalogon entsprechen;

bei dem höhermolekulare Substanzen aus einer wäßrigen Lösung des Preproinsulins durch eine erste Chromatographie an einem Anionenaustauscher im Durchflussmodus und eine anschließende zweite Chromatographie an einem Kationenaustauscher im Adsorptionsmodus abgetrennt werden.

- 10 2. Verfahren zur chromatographischen Reinigung des gentechnologisch hergestellten Preproinsulins der Formel 1, wobei das Preproinsulin folgende Aminosäuresequenz hat:

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Pro-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO: 2).

- 20 3. Verfahren zur chromatographischen Reinigung des gentechnologisch hergestellten Preproinsulins der Formel 1, wobei das Preproinsulin folgende Aminosäuresequenz hat:

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr-Arg-Arg-Glu-Ala-Glu-Asp-Pro-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Gly (SEQ ID NO: 3).

4. Verfahren zur chromatographischen Reinigung des gentechnologisch hergestellten Preproinsulins der Formel 1, wobei das Preproinsulin folgende Aminosäuresequenz hat:

Ala-Thr-Thr-Ser-Thr-Gly-Asn-Ser-Ala-Arg-Phe-Val-Lys-Gln-His-Leu-Cys-Gly-  
 Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-  
 Thr-Pro-Glu-Thr-Arg- Asp-Val-Pro-Gln-Val-Glu-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-  
 5 Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-Lys-Arg-Gly-Ile-Val-  
 Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn  
 (SEQ ID NO: 4).

5. Verfahren gemäss den Ansprüchen 1 bis 4 zur Abtrennung von  
 10 Fremdsubstanzen aus den Lösungen von Preproinsulinen, welche die  
 Denaturierung von Insulin induzieren.
6. Verfahren gemäss den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass  
 15 die zweite Chromatographie bei einem pH-Wert von 3,0 bis 5,5 durchgeführt  
 wird.
7. Verfahren gemäss den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass  
 die zweite Chromatographie bei einem Druck von 1 bis 30 bar durchgeführt  
 20 wird.
8. Verfahren zur Herstellung von Insulin durch Expression ungefalteten  
 Preproinsulins, umfassend die Schritte:
  - a) Fermentation von gentechnisch veränderten Mikroorganismen, welche  
 ungefaltetes Preproinsulin exprimieren
  - 25 b) Ernten der Mikroorganismen und Zellaufschluß
  - c) Isolierung der Einschlusskörper mit ungelöstem, ungefalteten Preproinsulin
  - d) Auflösen des Preproinsulins mit korrekter Faltung der Peptidkette und mit  
 gleichzeitiger Schließung der Disulfidbrücken zum Preproinsulin und  
 anschließendem Durchlaufen eines Verfahrens gemäß den Ansprüchen 1 - 7
  - 30 e) Enzymatische Spaltung des Preproinsulins zum Humaninsulin
  - f) Reinigung des Humaninsulins
  - g) Kristallisation des Humaninsulins und Trocknung

### Zusammenfassung

- 5 Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur chromatographischen Reinigung von Preproinsulinen bei dem höhermolekulare Substanzen aus einer wäßrigen Lösung des Preproinsulins durch eine erste Chromatographie an einem Anionenaustauscher im Durchflussmodus und eine anschließende zweite Chromatographie an einem Kationenaustauscher im
- 10 Adsorptionsmodus abgetrennt werden, sowie auf ein Verfahren zur Herstellung von Insulinen, welches das Verfahren zur Herstellung von Preproinsulinen miteinschließt.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

<120>

<130>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:C-Peptid

<400> 1

Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg  
20 25

<210> 2

<211> 96

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Preproinsulin

I

<400> 2

Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His Leu  
1 5 10 15

Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg  
20 25 30

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln  
35 40 45

Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln  
 50 55 60

Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln  
 65 70 75 80

Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
 85 90 95

<210> 3

<211> 96

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Preproinsulin

II

<400> 3

Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His Leu  
 1 5 10 15

Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg  
 20 25 30

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln  
 35 40 45

Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln  
 50 55 60

Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln  
 65 70 75 80

Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly  
 85 90 95

<210> 4



<211> 90

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Preproinsulin

III

<400> 4

Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His Leu  
1 5 10 15

Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg  
20 25 30

Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu  
35 40 45

Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly  
50 55 60

Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys  
65 70 75 80

Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
85 90